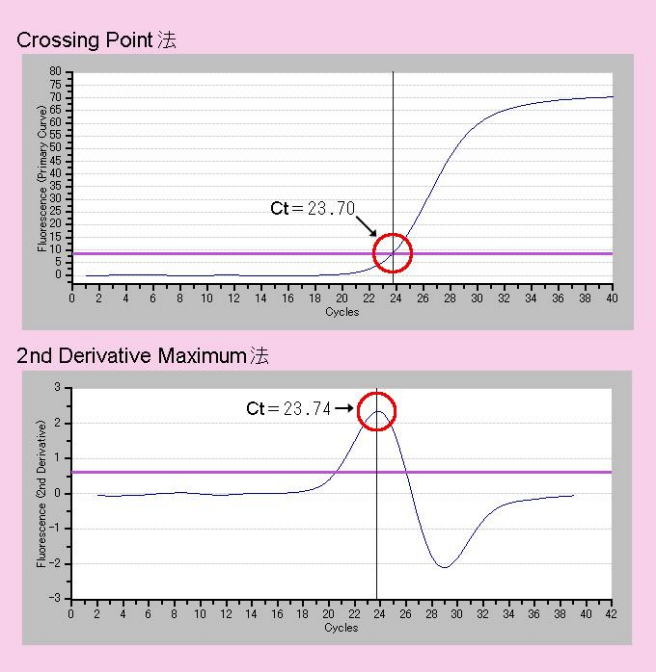
解析法

１．Ct 値の算出方法

Ct 値の算出方法には、閾値と増幅曲線の交点を Ct 値とする方法（Crossing Point 法）の他に、増幅曲線の 2 次導関数を求めてそれが最大となる点を Ct 値とする方法がある（2nd Derivative Maximum 法)。前者では、閾値を指数関数的増幅域の任意の位置に設定して解析するが、その位置により Ct 値が変化するので実験間の誤差が大きくなりやすい。一方、後者は、もっとも増幅速度の変化率が大きい時点を Ct 値とするので､閾値により Ct 値が変化することがなく再現性が高い。また、装置の検出誤差による影響も排除できるため、高精度な方法である。しかし、後者の計算方法にも対応しているリアルタイム PCR 装置は、Thermal Cycler Dice Real Time System、Smart Cycler（以上、タカラバイオ社）やLightCycler（ロシュ社）など一部の装置に限られている。



２．検量線

スタンダードサンプルの希釈系列により得られた検量線は､未知サンプルの定量に適用できるだけでなく、そこからは、PCR 増幅効率や定量可能な範囲など、有用な情報を得ることができる。実際に検量線を作成する際には、まず、５～６段階濃度のスタンダードサンプルを用意する。次に、これらを鋳型としてリアルタイム PCR を行い、それぞれの濃度の Ct 値を算出する。Ct 値と初期鋳型濃度の対数値は直線関係にあり、検量線を作成することができる。

【良い検量線とは？】

検量線を評価するポイントは、傾きと直線性の２つである。傾きからは PCR 増幅効率を計算することができ、80～120%が適正範囲とされる。PCR 増幅効率が悪い場合には、プライマーを再設計する。PCR 増幅効率が理論値より高い場合には、逆転写反応または PCR の阻害物質の存在が疑われるので、試料の調製方法を再検討する。直線性は、相関係数（r^2）で評価し、その値が 0.98

以上であることが望ましい。低濃度あるいは高濃度のポイントが直線からはずれる場合には、それらのポイントを除いて相関係数が 0.98 以上になるようにする。濃度に関係なくバラツキがあり相関係数が 0.98 に満たない場合は、実験系全体を見直したほうがよい。リアルタイム PCR は精度の高い技法で、通常、検量線の直線性が問題となるようなケースはまれである。

【増幅効率の算出法】
リアルタイム PCR 装置によっては、検量線の傾きから自動的に PCR 増幅効率が算出されるものもあるが、検量線の傾きが分かっていれば、次のような数式を用いて自分で計算することもできる。ただし、検量線の X 軸、Y 軸の取り方と初期鋳型量を対数に変換したときの底により数式が異なるので注意する。

$$E = 10^{[-1/slope]} - 1$$

(X 軸に初期鋳型濃度(Log10)を Y 軸に Ct 値を取った場合)

現在は、検量線の傾きから PCR 増幅効率を求めるのが一般的であるが、この方法では、①PCR 効率を overestimate しがちであること、② 個々のサンプルにより PCR 阻害物の含量が異なる場合にはそれぞれ PCR 増幅効率が異なるが、その対応が困難であること、などの理由から新しい PCR 増幅効率の計算方法も考案されている。それらの方法では、指数関数的領域の増幅曲線の傾きから PCR 増幅効率を算出するので、検量線は必要ない。スタンダードサンプルの測定が不要で反応数を少なくできること、個々のサンプルについて PCR 増幅効率を確認できることなどのメリットがある。

【検量線作成用のスタンダードサンプル】
検量線作成用のスタンダードサンプルとしては、基本的に、目的遺伝子の配列を有している DNA や RNA なら何でも使用できる（プラスミド DNA や *in vitro* 転写産物など)。しかし、スタンダードサンプルと実際に測定する未知サンプルについて PCR 増幅効率が一致していなくてはならないので、極端に形状が異なる DNA はスタンダードサンプルとして適当ではない。例えば、ゲノム DNA に組み込まれた遺伝子のコピー数を定量するときに、プラスミド DNA をスタンダードとして使用すると正確な結果が得られないことがある。これは、サイズが大きく複雑な配列を有するゲノム DNA と小さなプラスミド DNA とでは同じプライマーを用いても PCR 反応性が一致しないことがあるためである。
スタンダードサンプルとしては、できるだけ測定対象である実サンプルの形状に近いものが望ましい。mRNA 発現解析には目的遺伝子が発現している total RNA（あるいは total RNA を鋳型として合成した cDNA）を、SNPs タイピングには Wild タイプと Mutant タイプのゲノム DNA をスタンダードとして使用する。このようなスタンダードの入手が困難な場合は、目的の配列を合成することになるが、その場合にもプライマーがアニーリングする配列と PCR 増幅領域だけでなくその前後の配列も少し加えた配列を合成すると良い。

◎できるだけ実サンプルに近い形状の DNA または RNA がスタンダードとして望ましい。

【RNA と cDNA のどちらを段階希釈するか】
リアルタイム RT-PCR でスタンダードサンプルとして RNA を使用して検量線を作成する場合、①逆転写反応によって得られた cDNA を段階希釈してリアルタイム PCR を行う方法と、② RNA を段階希釈して逆転写反応およびリアルタイム PCR を行う方法の２通りが考えられる。これらは似ているようだが、厳密には評価している内容が異なり、何を評価するかによっていずれか適切な方を選択すべきである。

① cDNA を段階希釈する方法
この方法で作成される検量線には逆転写反応は関係なく、純粋に PCR 増幅効率を評価することができる。なお、適切なバッファー（EASY Dilution（for Real Time PCR）；製品コード 9160）で段階希釈した cDNA サンプルは、凍結融解を繰り返さなければ冷凍保存して後の解析に使用することができる。

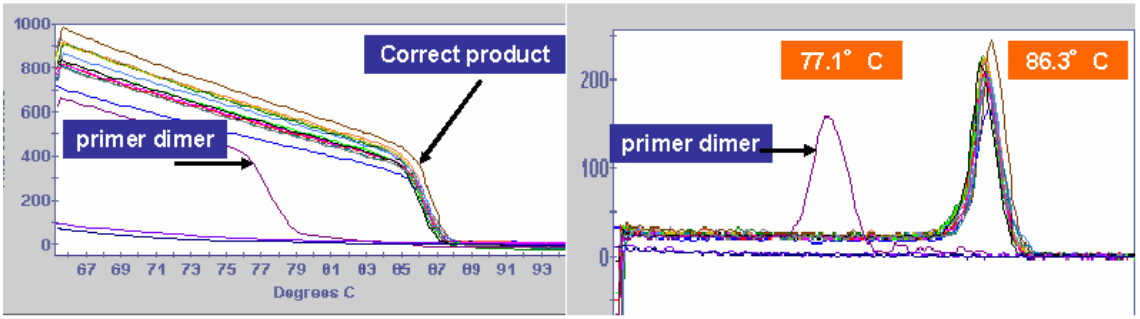
② RNA を段階希釈する方法
この方法で作成される検量線は、鋳型 RNA の量依存的な逆転写効率の変動と PCR 増幅効率の両方を反映している。①の解析と併せて行うことにより、逆転写反応の評価を行うことができる。同じ量の RNA を使用すると、理想的には①と②の検量線は一致すると考えられ、両者にズレが生じた場合、その部分は逆転写反応に起因するものと推測される。このようなズレがよく観察されるケースとして、鋳型 RNA 量が多すぎる場合が挙げられる。検量線を作成すると、もっとも RNA 量が多いポイントだけ予想よりも逆転写の効率が低い場合があり、この原因としては、RNA 量が多すぎて十分に逆転写反応が行われなかった、または、RNA に逆転写反応を阻害するような物質が混入していたといったことが疑われる。いずれの原因であっても、この RNA 量はこの系で使用可能な上限を超えてしまっていることが分かる。以上のように、②の検量線からは適切な RNA 使用量を知ることができる。

実際のリアルタイム RT-PCR 実験において重要なのは各プライマーによる PCR の増幅効率であり、①の検量線を定量に用いるとよいだろう。②の検量線からは適切な RNA 使用量を知ることができるが、いつも同じ逆転写反応系を用いている限り、その範囲は大きく変動するものではない。一度、確認しておけば十分で、RNA に逆転写反応阻害物質が混入している心配がない限り、毎回、実施する必要はないだろう。
①の検量線では「逆転写の効率を無視している」と指摘されることがあるが、②の検量線の傾きも逆転写の効率を表している訳ではない。①と②の検量線を比較すると、RNA 量依存的な逆転写効率の変動を確認することはできるが、逆転写効率の測定はできない。また、実際の発現解析では、一定量の RNA を用いてサンプル間の比較を行うので、RNA の量依存的な逆転写効率の変動があったとしても結果に影響を与えることは少ない。その RNA 量が適正な範囲内であれば、それで良いということである。

◎ PCR 増幅効率を知りたいときは、cDNA を段階希釈する。
適切な RNA 使用量を知りたいときは、RNA を希釈する。

３．融解曲線分析

増幅曲線の検出にインターカレーター（TB Green など）を用いる場合には、融解曲線分析により増幅産物の確認を行うことができる。融解曲線分析では、PCR 後に PCR 反応液の温度を徐々に上げて行き、インターカレーターの蛍光シグナルをモニタリングする。最初は、PCR 増幅産物が二本鎖を形成し蛍光シグナルを発しているが、ある一定の温度に達すると一本鎖に解離し、インターカレーターの蛍光シグナルは急激に低下する。このときの温度が融解温度（Tm 値）であり、増幅産物の配列に固有の値である。



【融解曲線分析と電気泳動】

以前に使用した実績のあるプライマーでは、融解曲線分析で PCR 増幅産物の Tm 値を調べ、正しい増幅が行われたことを確認できるが、はじめて使用するプライマーでは、その PCR 増幅産物の Tm 値が分からないので、融解曲線分析だけでは判断できない。新しいプライマーを用いるときは、融解曲線分析の Tm 値を調べるとともに、一度、PCR 増幅産物を電気泳動して正しいサイズの断片が得られていることを確認しておく。さらに、必要に応じて増幅産物のシークエンス解析まで行うこともある。

単一の断片が増幅している場合には、通常、融解曲線はシングルピークとなる。融解曲線がブロードであったり、２つ以上のピークが出たりした場合には、非特異的増幅が起こっている可能性が高い。例外的に、ピークの肩部分にマイナーピークがあるような場合には、それらの PCR 増幅産物を電気泳動してみると、単一バンドとして検出されることがある。これは、増幅した断片に GC 含量などの偏りがあり、融解曲線分析の際に一気に解離しなかったためであり、この場合には、融解曲線分析がシングルピークにならなくても問題ない。

４．絶対定量と相対定量

定量方法には、大きく分けて絶対定量と相対定量の２種類がある。絶対定量では、未知サンプルの絶対量（コピー数）を測定するが、相対定量では、遺伝子の絶対量ではなく、ターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子の測定を行い、リファレンス遺伝子に対するターゲット遺伝子の相対量を求めてサンプル間で比較する。

【絶対定量】

標準サンプルを用いて検量線を作成し、未知サンプルの絶対量を測定する方法である。絶対量（コピー数）が既知で、未知サンプルと同じ配列を持った標準サンプルが必要である。

【相対定量】
相対定量は、遺伝子発現解析で一般的に用いられており、ある遺伝子の発現量が未知サンプルにおいてコントロールサンプルに対してどれだけ増減しているか、ということを解析する方法である。相対定量実験では、発現量を求めたいターゲット遺伝子の他に、必ずリファレンス遺伝子の測定も行う。リファレンス遺伝子は、サンプル間の鋳型量の標準化を行うためのものであり、遺伝子発現解析の実験では通常、ハウスキーピング遺伝子が用いられる（５．補正方法を参照)。解析時には、まず、リファレンス遺伝子の定量値を用いてサンプル間の鋳型量の標準化を行い、次に、標準化された値をコントロールサンプルと比較して発現量の変動を調べる(詳しくは、「６．相対定量解析の手順」を参照)。なお、相対定量には、検量線を用いて定量する一般的な方法の他に、検量線を用いずに定量できる方法もある。

【検量線法】
スタンダードサンプルを用いて検量線を作成し、未知サンプルの濃度を決定する一般的な定量方法である。定量するすべての遺伝子について検量線を作成し定量する。

【ΔΔCt 法】
ΔΔCt 法では、検量線を作成せずに定量を行うことができる。ただし、測定するすべての遺伝子について PCR 増幅効率がほぼ一定であることが前提なので、予備実験を行い、各遺伝子について PCR 増幅効率を調べておく必要がある。

５．補正方法

理想的には、サンプルあたりの細胞数または総 mRNA 発現量を測定して比較したいが、それは現実的には不可能である。そこで、リアルタイム RT-PCR による発現解析では、ハウスキーピング遺伝子の発現量で補正を行うことが多い。正確な解析結果を得るには、その実験系で発現量が変動しないハウスキーピング遺伝子を選んで用いることが重要であり、そのようなハウスキーピング遺伝子は、実験系ごとに異なるので、その都度、選びなおさなくてはならない。

【ハウスキーピング遺伝子】
従来、ハウスキーピング遺伝子としては、GAPDH やβアクチンがよく用いられてきたが、近年、これらの遺伝子も実験条件によっては変動するケースがあることが報告されている。１種類のハウスキーピング遺伝子では正確な補正を行うには不十分であり、現在、もっとも信頼性が高いとされている補正方法は、複数のハウスキーピング遺伝子を用いる方法である。この方法では、いくつかのハウスキーピング遺伝子の発現量を測定し、その中で変動が小さいと思われるものを選択して使用する。最適な補正用遺伝子を選択するソフトウェアも開発されており、ダウンロードして利用できる（geNorm, BestKeeper など)。マイクロアレイによる発現プロファイルのデータがある場合には、その結果から類推することもできる。１種類のハウスキーピング遺伝子を用いるよりも信頼性は高くなるが、非常に労力を要する方法である。

【Ribosomal RNA】
Ribosomal RNA が補正に用いられることもある。28S rRNA と 18S rRNA とでは、28S rRNA の方が mRNA の補正に適しているとされる。それは、mRNA が分解を受けた際、18S rRNA はインタクトな状態で残りやすく、mRNA の分解状態を反映しにくいためである。しかし、補正に rRNA を用いるには、いくつか問題点がある。まず、rRNA を転写する RNA ポリメラーゼは mRNA のそれと異なるため、両者で発現の状態が異なっている可能性がある。そして、rRNA の存在量は、mRNA に比べて圧倒的に多いため、正確な補正ができるのか疑問である。また、rRNA には poly(A) tail がないので、oligo dT プライマーを用いる場合には、rRNA による補正はできない。

【total RNA】
total RNA の量により補正する方法もあるが、濃度測定が正確に行われていることが前提である。また、total RNA に含まれる mRNA の量が一定とは限らず、そのようなことが保証できない実験系では適用できない。

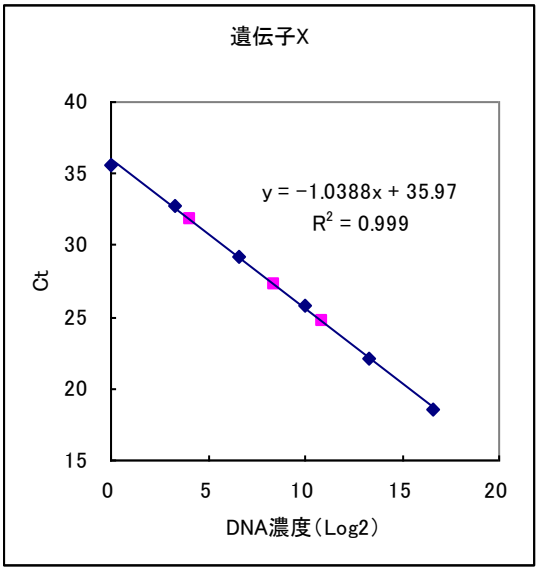
６．相対定量解析の手順

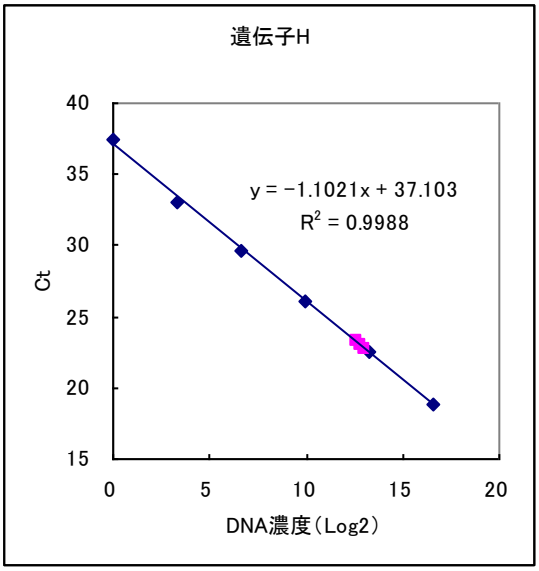
通常の遺伝子発現解析では、ハウスキーピング遺伝子の発現量により RNA 量を補正して、目的遺伝子の発現量を相対定量する。ここでは、実験例を交えながら具体的な相対定量解析の手順を解説する。

【モデル実験の内容】
3 種類の RNA サンプル（A, B, C）について、“遺伝子 X”の mRNA 発現量を比較する。また、ハウスキーピング遺伝子として“遺伝子 H”の測定も行う。

【相対定量解析例】
① 遺伝子 X と遺伝子 H のそれぞれについて 6 段階濃度のスタンダードを用いて検量線を作成し、そこに未知サンプル A, B, C の Ct 値を当てはめて初期鋳型量を算出する。（＊1：定量結果）
② 鋳型として使用した 3 種類の total RNA サンプルは、mRNA の含量がそれぞれ異なる可能性があるので、ハウスキーピング遺伝子の発現量で mRNA 量を補正する。具体的には、目的遺伝子（遺伝子 X）の定量結果をハウスキーピング遺伝子（遺伝子 H）の定量結果で割った値を求めればよい。（＊2：補正値）
③ 発現量の差を把握しやすいように、RNA サンプル A の発現量を“1”としたときの相対量で表す。（＊3：相対量）

	遺伝子 X			遺伝子 H		
	既知量	Ct	定量結果*1	既知量	Ct	定量結果*1
スタンダード 1	1	35.66	-	1	37.46	-
スタンダード 2	10	32.77	-	10	33.06	-
スタンダード 3	100	29.20	-	100	29.69	-
スタンダード 4	1000	25.75	-	1000	26.10	-
スタンダード 5	10000	22.06	-	10000	22.51	-
スタンダード 6	100000	18.62	-	100000	18.88	-
RNA サンプル A	-	27.22	343.4	-	23.17	6391.5
RNA サンプル B	-	31.70	17.3	-	22.70	8589.7
RNA サンプル C	-	24.62	1946.1	-	22.93	7432.9





	遺伝子 H	遺伝子 X		
	定量結果*1	定量結果*1	補正値*2	相対量*3
RNA サンプル A	6391.5	343.4	0.0537	1.000
RNA サンプル B	8589.7	17.3	0.0020	0.037
RNA サンプル C	7432.9	1946.1	0.2618	4.874

実験例では、相対定量の結果から目的遺伝子 X は、サンプル A を“1”とした場合、サンプル B、C ではそれぞれ“0.037”、“4.874”に発現量が増減していることが分かった。このように、相対定量は、同一遺伝子の発現量を異なるサンプル間で比較する方法であり、逆に、異なる遺伝子が同一サンプル内でどのような量比で発現しているかを正確に求めることはできない。相対定量で比較できるものとできないものをよく理解しておくことが重要である。

参考

マルチプレックス PCR による遺伝子発現解析　・・・・

遺伝子発現解析をマルチプレックス PCR で行う場合、必ず 1 本のチューブ内でターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を同時検出するように組み合わせる。例えば、3 種類のターゲット遺伝子 A、B、C を解析する場合、以下のようになる。

【正しい組合せ】

チューブ①　　ターゲット遺伝子 A ＆ リファレンス遺伝子
チューブ②　　ターゲット遺伝子 B ＆ リファレンス遺伝子
チューブ③　　ターゲット遺伝子 C ＆ リファレンス遺伝子

【誤った組合せ】

チューブ①　　ターゲット遺伝子 A ＆ ターゲット遺伝子 B
チューブ②　　ターゲット遺伝子 C ＆ リファレンス遺伝子

正しい組合せでマルチプレックス PCR を行うと、まったく同一の鋳型からターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を検出できるので、鋳型の分注誤差の影響を小さく抑えることができる。なお、マルチプレックス PCR の利点として試薬や鋳型の節約が挙げられることがあるが、解析する遺伝子数が多いほどそのような効果は薄れてくる。（すべてのチューブでリファレンス遺伝子の測定を行うため、リファレンス遺伝子検出用のプローブ使用量は、かえって大幅に増える。）また、マルチプレックス PCR の系構築は、比較的難しい作業でもあり、マルチプレックス PCR は、汎用的な解析にはあまり適していない。

参考

誤差範囲の計算方法　・・・・

誤差範囲の計算方法は、解析手法（検量線法／ΔΔCt 法、シングル PCR／マルチプレックス PCR）によって異なる。シングル PCR の場合には、ターゲット遺伝子を測定したチューブとリファレンス遺伝子を測定したチューブとの間に対応関係がないため、個々の定量値を求めた段階で平均し標準偏差を求める。マルチプレックス PCR では、ターゲット遺伝子とリファレンス遺伝子を同一チューブで測定するため、対応関係が存在する。この場合には、リファレンス遺伝子の定量値でサンプル間の標準化を行った段階で平均し標準偏差を求める。以後の相対定量解析で、平均値の除算や減算を行う際、標準偏差も専用の計算式に当てはめて演算する。計算方法の詳細は、User Bulletin #2（Applied Biosystems 社）が参考になる。